



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado em Medicina Interna de Animais de Companhia
Dissertação Final de Mestrado

**Proteínas de Fase Aguda e Biomarcadores de Stresse Oxidativo
em Gatos com Linfoma**

Érico Augusto Rezende

Coimbra, fevereiro 2025





ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado em Medicina Interna de Animais de Companhia
Dissertação final de Mestrado

**Proteínas de Fase Aguda e Biomarcadores de Stresse Oxidativo
em Gatos com Linfoma**

Coimbra, fevereiro 2025

Érico Augusto Rezende

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Doutora Sofia Ferreira Anastácio
(Escola Universitária Vasco da Gama)

Arguente: Doutora Ana Cristina Silvestre Ferreira
(Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro)

Orientador: Doutor Hugo Corte-Real Vilhena
(Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar –
Universidade do Porto)

Trabalho realizado sob a orientação de

Doutor Hugo Corte-Real Vilhena (EUVG/ICBAS-UP)

Doutor Damián Escribano Tortosa (Interlab –
Universidade de Múrcia)

Mestre María Botía González (Interlab - Universidade
de Múrcia)



Dissertação Final de Mestrado
em Medicina Interna de Animais de Companhia da EUVG



ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	iv
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	v
RESUMO	2
PALAVRAS-CHAVE.....	2
ABSTRACT	3
KEYWORDS	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	6
2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA	9
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO	12
5. CONCLUSÃO	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos gatos com linfoma e gatos saudáveis incluídos no estudo.....	7
Tabela 2. Concentração sérica de SAA, Hp, BChE, IGF 1, Tiol, TEAC, CUPRAC e FRAP nos gatos com linfoma (n=24) e nos gatos do grupo controlo (n=12)	10
Tabela 3. <i>P</i> -valor da influência das características clinicopatológicas dos animais com linfoma de alto grau na concentração sérica das proteínas de fase aguda e biomarcadores de stresse oxidativo analisados.....	11



LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGP - Glicoproteína ácida alfa 1 (do Inglês *alpha 1 acid glycoprotein*)

BChE - Butirilcolinesterase (do Inglês *butyrylcholinesterase*)

CUPRAC - Capacidade antioxidante redutora cúprica (do Inglês *cupric reducing antioxidant capacity*)

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FRAP - Capacidade antioxidante redutora férrica (do Inglês *ferric reducing antioxidant capacity*)

FeLV - Vírus da leucemia felina (do Inglês *feline leukemia virus*)

FIV - Vírus da imunodeficiência felina (do Inglês *feline immunodeficiency virus*)

Hp - Haptoglobina

IGF 1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (do Inglês *insulin-like growth factor 1*)

IQT - Intervalo interquartil (do Inglês *interquartil range*)

PFA - Proteínas de fase aguda

RFA - Resposta de fase aguda

SAA - Proteína sérica amilóide A (do Inglês *serum amyloid A*)

TAC - Capacidade antioxidante total (do Inglês *total antioxidant capacity*)

TEAC – Capacidade antioxidante trolox (do Inglês *trolox equivalent antioxidant capacity*)

Tiol - Tiol sérico total



Proteínas de fase aguda e biomarcadores de stresse oxidativo em gatos com linfoma

Érico Rezende^a, Damián Escribano^b, Maria Botía González^b, Hugo Vilhena^{c,d,e,f}

^a. Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (ericorezendevet@gmail.com)

^b. Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas da Universidade de Múrcia (Interlab-UMU), Edifício Pleidades, 3^a Planta, Campus de Espinardo, Universidade de Múrcia, Múrcia, Espanha (det20165@um.es, maria.botiag@um.es)

^c. Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (hugo.vilhena@uevg.pt)

^d. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Departamento de Clínicas Veterinárias, Rua Jorge de Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

^e. Laboratório Associado de Ciência Animal e Veterinária AL4Animals, Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), Avenida da Universidade Técnica 1300-477, Lisboa, Portugal

^f. Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), 5000-801 Vila Real, Portugal



RESUMO

O linfoma é um dos tumores mais comuns em gatos e pode desenvolver-se em qualquer tecido. A etiologia é multifatorial, e ainda não completamente conhecida, mas diferentes fatores (isolados ou em associação) têm sido implicados na carcinogênese do linfoma felino, incluindo agentes infecciosos, inflamatórios, genéticos, alimentares e inalatórios, a idade, entre outros. A sua apresentação clínica é muito variada, e dependente do órgão ou tecido que é afetado pelo linfoma. Em muitos casos o diagnóstico é rápido e assertivo, no entanto, em alguns casos é desafiador. Da mesma forma, a resposta ao tratamento, e consequentemente o prognóstico, são variáveis e também influenciados por diversos fatores relacionados com o tumor, o animal, o tutor e a disponibilidade de métodos de tratamento.

A identificação de biomarcadores que possam ser úteis no diagnóstico, na monitorização da evolução da doença e/ou da resposta ao tratamento, no prognóstico, e que possam ser potenciais alvos terapêuticos é de extrema importância em oncologia humana e veterinária. As proteínas de fase aguda (PFA) e os parâmetros de stresse oxidativo têm sido estudados como biomarcadores de diferentes doenças em medicina humana e veterinária, incluindo em doenças oncológicas. No entanto, a informação científica disponível sobre a resposta inflamatória aguda e o estado oxidativo em gatos com linfoma é escassa. Assim, o presente estudo teve como principais objetivos avaliar a resposta das PFA e a resposta antioxidante em gatos com linfoma de alto grau.

No presente estudo foram incluídos 36 gatos, dos quais 24 gatos com linfoma de alto grau e 12 gatos clinicamente saudáveis (grupo controlo). As PFA proteína sérica amiloide A (SAA), Haptoglobina (Hp), butirilcolinesterase (BChE) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF 1), e os biomarcadores de stresse oxidativo tiol sérico total (Tiol) e capacidade antioxidante total (TAC) determinada através de três métodos diferentes (TEAC, CUPRAC e FRAP), foram determinados em amostras de soro dos animais doentes (colhidas no momento do diagnóstico e antes da administração de qualquer tratamento) e dos animais do grupo controlo.

No momento do diagnóstico, os animais doentes apresentaram concentrações séricas de SAA significativamente superiores, e de IGF 1, BChE, TEAC e CUPRAC significativamente inferiores aos animais saudáveis. Para além disso, no momento do diagnóstico, os animais doentes com efusão pleural apresentaram níveis séricos de BChE significativamente inferiores aos dos animais sem efusão. Adicionalmente, a concentração sérica de IGF 1 foi significativamente inferior em gatos doentes infetados por FIV e FeLV do que nos animais não infetados, e em gatos doentes não castrados do que em gatos doentes castrados.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a SAA, BChE, IGF 1, TEAC e CUPRAC poderão ser biomarcadores clinicamente úteis em gatos com linfoma. No entanto, estudos futuros envolvendo um maior número de animais e com monitorização da concentração sérica destes analitos ao longo da progressão da doença serão necessários para melhor compreender a sua aplicação na prática clínica.

PALAVRAS-CHAVE

Antioxidantes; felino; linfoma; oxidantes; proteínas de fase aguda; stresse oxidativo



ABSTRACT

Lymphoma is one of the most common tumors in cats and can develop in any tissue. The etiology is multifactorial and not yet fully understood, but different factors (isolated or in combination) have been implicated in the carcinogenesis of feline lymphoma, including viral and bacterial, inflammatory, genetic, dietary and inhalation, age, among others. The clinical presentation is varied and depends on the organ or tissue affected by the lymphoma. In many cases diagnosis is rapid and assertive, but in some cases might be challenging. Likewise, the response to treatment, and consequently the prognosis, are variable and influenced by several factors related to the tumor, the animal, the owner and the availability of treatment methods.

The identification of biomarkers that might be useful in diagnosis, in monitoring the progression of the disease and/or the response to treatment, in prognosis, and that might be potential therapeutic targets is of extreme importance in human and veterinary oncology. Acute phase proteins (PFA) and oxidative stress parameters have been studied as biomarkers of different diseases in human and veterinary medicine, including oncological diseases. However, scientific information available on the acute inflammatory response and oxidative status in cats with lymphoma is scarce. Therefore, the present study aimed to evaluate the AFP and the antioxidant responses in cats with high grade lymphoma.

Thirty-six cats were included in the present study, of which 24 cats with high-grade lymphoma and 12 clinically healthy cats (control group). Acute phase proteins serum amyloid A (SAA), haptoglobin (Hp), butyrylcholinesterase (BChE) and insulin-like growth factor 1 (IGF 1), and the biomarkers of oxidative stress total serum thiols (Tiol) and total antioxidant capacity (TAC) determined through three different methods (TEAC, CUPRAC and FRAP) were determined in serum samples from diseased animals (collected at the time of diagnosis and before administration of any treatment) and from animals of the control group.

At diagnosis, diseased animals had significantly higher serum concentrations of SAA, and significantly lower serum concentrations of IGF 1, BChE, TEAC and CUPRAC than healthy animals. Furthermore, at diagnosis, animals with pleural effusion had serum BChE concentrations significantly lower than animals without effusion. Additionally, serum IGF 1 concentrations were significantly lower in cats with lymphoma infected with FIV and FeLV than in uninfected animals, and in non-castrated diseased cats than in castrated cats.

The results obtained in the present investigation suggest that SAA, BChE, IGF 1, TEAC and CUPRAC could be clinically useful biomarkers in feline lymphoma. However, future studies, involving a larger number of animals and with monitoring of the serum concentration of these analytes throughout the progression of the disease will be necessary to better understand their application in clinical practice.

KEYWORDS:

Acute phase proteins; antioxidants; feline; lymphoma; oxidants; oxidative stress.



1. INTRODUÇÃO

O linfoma é o tumor hematopoiético mais comum no gato, sendo também o tumor hematopoiético com maior prevalência na maioria das espécies (Moore *et al.*, 2012). Estudos indicam que pode representar até um terço de todas as neoplasias felinas (Schmidt *et al.*, 2010). É definido como a proliferação de células linfoides malignas, podendo comprometer linfonodos e órgãos como fígado e baço, entre outros, podendo ter origem em qualquer tecido (Vail, 2017). A apresentação clínica, a resposta ao tratamento e consequentemente o prognóstico, podem ser muito variáveis, dependendo de diferentes fatores tais como a genética do animal, da competência do seu sistema imunitário, da localização anatômica e do subtipo morfológico do linfoma (Burkhard *et al.*, 2013).

Anteriormente, a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) era o principal fator que justificava a elevada prevalência deste tumor em gatos; no entanto, atualmente, mesmo com o desenvolvimento e implementação da administração da vacina de FeLV, e com a identificação e isolamento dos animais doentes, não ocorreu diminuição da prevalência desta neoplasia em gatos, o que sugere o envolvimento de outros fatores (Louwerens *et al.*, 2005). A exposição ao fumo do tabaco (Bertone *et al.*, 2002), predisposição racial dos gatos da raça siamês, que sugere risco hereditário (Louwerens *et al.* 2005), alterações genéticas como a atividade da telomerase que impede a célula de sofrer apoptose, a inflamação crônica no intestino (Vail, 2013), para além da infecção por FeLV e FIV, são fatores que de maneira direta ou indireta foram associadas à carcinogénese do linfoma felino (Hartmann, 2012). Os linfomas felinos associados à infecção por FeLV desenvolvem-se em geral a partir de linfócitos T, e são associados a gatos mais jovens e à forma mediastínica, embora estejam também associados ao linfoma multicêntrico (Louwerens *et al.*, 2005; Versteegh *et al.*, 2023). Já os linfomas felinos associados à infecção por FIV têm origem nas células B, desenvolvendo-se em locais extranodais e em gatos mais velhos (Versteegh *et al.*, 2023). Os linfomas não associados a retrovírus são de linhagem de células B ou T e tendem a ser mais específicos de órgãos e solitários, como linfoma renal e linfoma intestinal (Richter 2003). O seu diagnóstico pode ser estabelecido através de citologia, histopatologia ou técnicas moleculares, sendo na maioria dos casos rápido e assertivo, embora alguns casos possam representar um maior desafio diagnóstico (Thrall, 2007; Valli, 2007; Gambini *et al.*, 2021; Kleinschmidt *et al.*, 2010).

É uma doença que raramente pode ser curada, no entanto, a quimioterapia tem o potencial de induzir uma remissão completa e prolongar a vida do animal na maioria dos casos, geralmente com poucos efeitos secundários; no entanto as recidivas são comuns, sendo necessários novos tratamentos para melhoria dos resultados (Thamm, 2019).

As proteínas de fase aguda (PFA) são biomarcadores sensíveis à inflamação, independente da sua etiologia (traumática, infecciosa, imunomediada, inflamatória primária ou neoplásica) (Ceron *et al.*, 2019; Escribano *et al.*, 2021). A inflamação é uma resposta a estímulos biológicos, químicos e físicos, que originam eventos celulares e moleculares. Na fase aguda da resposta inflamatória, as células do sistema imunológico migram para o local da lesão, evento que é facilitado por mediadores solúveis, como as citocinas, quimiocinas e PFA. E dependendo da



lesão, esta fase pode ser suficiente para resolver o dano e iniciar o processo de cura (Germolec et al., 2018). A resposta de fase aguda (RFA) é uma reação sistêmica, imediata e inespecífica iniciada quando os animais são expostos a um estímulo inflamatório, que se inicia antes da resposta imunitária específica, muitas vezes antes do aparecimento dos sinais clínicos, tendo como objetivo limitar a lesão tecidual, eliminar a causa da agressão e restaurar a função normal e a homeostasia (Vilhena et al., 2019). O mesmo acontece quando o estímulo é tumoral, onde ocorre uma RFA típica, mesmo na ausência de um estímulo inflamatório exógeno (Gabay et al., 1999; Paltrinieri et al., 2008).

Em gatos, a proteína sérica amiloide A (SAA) é considerada uma PFA positiva maior, cuja concentração sérica aumenta algumas horas após o estímulo inflamatório, permanecendo elevada enquanto persistir a inflamação (Paltrinieri, 2008); a haptoglobina (Hp) é considerada uma PFA positiva moderada (Rossi et al., 2023); o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF 1) é uma hormona com uma função importante no crescimento e diferenciação de tecidos, além de ser considerada PFA negativa (Dabrowski et al., 2015) e a butirilcolinesterase (BChE) é considerada uma PFA negativa em gatos (Tvarijonaviciute et al., 2012).

O estado oxidativo de um indivíduo depende do equilíbrio entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes, desenvolvendo-se stresse oxidativo quando os radicais livres de oxigênio e azoto (agentes oxidantes) excedem a capacidade antioxidante do organismo (Mandelker, 2008). Este desequilíbrio pode causar lesões em macromoléculas celulares, como DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para o desenvolvimento de várias doenças, incluindo oncológicas, cardiovasculares e neurodegenerativas (Sies et al., 2017). A resposta antioxidante do organismo pode ser avaliada através da determinação de agentes antioxidantes isolados, como por exemplo os tióis séricos totais (Tiol), ou através da atividade antioxidante total (TAC), que avalia a resposta de diferentes agentes antioxidantes, assim como as suas interações (Forman et al., 2009; Vilhena et al., 2019). No entanto, a aplicação clínica de biomarcadores do estado oxidativo do organismo apresenta algumas limitações, nomeadamente a complexidade do processo e o número de componentes oxidantes e antioxidantes envolvidos (Sanchez-Rodriguez et al., 2019).

A identificação de biomarcadores que possam ser usados na prática clínica é de extrema importância em medicina humana e em medicina veterinária. Os biomarcadores poderão ser úteis no diagnóstico, monitorização da evolução da doença e/ou da resposta ao tratamento e prognóstico, para além de serem potenciais alvos terapêuticos. As PFA e os biomarcadores de stresse oxidativo têm sido estudados em diferentes doenças em medicina humana e veterinária, incluindo em doenças oncológicas (Hazuchova et al., 2016; Paltrinieri et al., 2016; Mitchell et al., 2009; Heini et al., 2020). No entanto, a informação científica disponível relativa a estes biomarcadores em medicina felina é muito escassa. Assim, este estudo teve como principais objetivos avaliar a resposta das PFA e a resposta antioxidante em gatos com linfoma de alto grau.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama, Parecer 05/2025. Foi obtida a autorização dos tutores dos animais avaliados para a sua inclusão neste estudo.

Foram incluídos neste estudo observacional transversal 24 gatos com diagnóstico de linfoma de alto grau determinado por citologia e/ou histopatologia, que foram apresentados em dois centros de atendimento médico veterinários de Portugal (Onevet Hospital Veterinário do Baixo Vouga e Onevet Hospital Veterinário Universitário de Coimbra). Foram incluídos animais com linfoma, em diferentes localizações anatómicas e em diferentes estadios clínicos. A caracterização clínica dos animais com linfomas é apresentada na tabela 1. Foram excluídos deste estudo gatos com linfoma que apresentavam, ao diagnóstico, doenças concomitantes, outro tipo de tumor ou história de neoplasia previamente diagnosticada. Foram realizados exame clínico e exames complementares de diagnóstico em todos os animais doentes incluídos no estudo, incluindo hematologia, perfil bioquímico sérico, avaliação dos linfonodos, radiologia torácica (três projeções), ecografia abdominal e citologia e/ou biópsia dos linfonodos/tecidos alterados para diagnóstico e estadiamento clínico. Os dados da identificação do animal e os parâmetros clínicos avaliados incluíram raça, sexo, estado reprodutivo, idade, peso, estado de infeção pelo FIV e FeLV, classificação anatómica do linfoma, estadio clínico e presença de efusão pleural ou abdominal.

Foram também incluídos 12 gatos considerados clinicamente saudáveis (grupo controlo), com base na história clínica, exame clínico e resultados de exames complementares de diagnóstico, e que necessitaram de análises hematológicas para procedimentos cirúrgicos eletivos, *check-ups* geriátricos ou determinação do estado de infeção por FIV e FeLV. A caracterização clínica dos gatos do grupo controlo é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos gatos com linfoma e saudáveis incluídos no estudo

	Gatos grupo linfoma (n=24)		Gatos grupo controlo (n=12)
Raça	EC	23	11
	Persa	1	1
Sexo	macho	12	3
	fêmea	12	9
Estado Reprodutivo	castrado	19	5
	não castrado	5	5
	sem informação		2
Idade (anos)	média	6,8	4,8
	min - máx	0,6 - 17	0,5 - 15
Peso (Kg)	média	4,0	3,5
	min - máx	2,3 - 6,7	2,2 - 5,0
Infeção FIV/FelV	FelV +	8	-
	FIV +	2	-
	FIV+ / FelV +	3	-
	FIV - / FelV -		12
	não determinado	11	-
Localização anatómica do linfoma	multicêntrico	3	
	mediastínico	13	
	alimentar	5	
	extranodal	2	
	nasal	1	
Estadio clínico	I	9	
	II	10	
	III	2	
	IV	1	
	não determinado	2	
Efusão pleural	com efusão	9	
	sem efusão	15	

EC, europeu comum; FelV, vírus da leucemia felina; FIV, vírus da imunodeficiência felina; máx, máximo; min, mínimo

A determinação da concentração sérica das PFA SAA, Hp, BChE e IGF 1, e dos biomarcadores de stresse oxidativo Tiol e TAC determinada por três métodos diferentes (TEAC, CUPRAC e FRAP), foi realizada em todos os animais do grupo doentes e todos os animais do grupo controlo, no laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas da Universidade de Múrcia (Interlab - UMU), Espanha. Apenas amostras de soro isentas de hemólise e lipemia foram utilizadas neste estudo devido à interferência analítica significativa com as determinações destes analitos. A determinação dos diferentes analitos foi realizada, em todos os casos, em excedentes de amostras de soro recolhidas no âmbito do plano diagnóstico de cada animal. Nenhuma amostra de sangue foi recolhida exclusivamente para este estudo.



A concentração sérica de SAA foi determinada através de um imunoensaio turbidimétrico humano (LZ-SAA; Eiken Chemical Co., Tóquio, Japão) previamente validado em gatos (Hansen et al., 2006). Resumidamente, as proteínas SAA presentes na amostra de soro reagem com os anticorpos anti-SAA presentes no reagente, causando aglutinação e alteração da turbidez da amostra, que é proporcional à concentração sérica de SAA. A concentração sérica de Hp foi determinada pelo método de ligação à hemoglobina com o uso de um kit comercial (Tridelta Development Ltd., Kildare, Irlanda) previamente validado em gatos (Tvarijonavičiute et al., 2012). Neste método, a hemoglobina livre presente no reagente liga-se às moléculas de Hp da amostra, proporcionalmente à concentração sérica de Hp, e a atividade peroxidase da hemoglobina ligada é inibida a pH baixo. A concentração sérica de BChE foi determinada por espectrofotometria. Neste método, a atividade de BChE foi determinada através da avaliação da hidrólise do substrato butiriltiocolina e usando ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico através de um método também previamente validado para uso em gatos (Tvarijonavičiute et al., 2012). A concentração sérica de IGF 1 foi determinada usando um ensaio imunoquimioluminescente automatizado em fase sólida marcado com enzima (immulite System; Siemens Health Diagnostics, Malvern, EUA) previamente validado em gatos (Tvarijonavičiute et al., 2012). Sucintamente, este método baseia-se na utilização de anticorpos anti-IGF 1 presentes no reagente para detetar a IGF 1 sérica, em ambiente ácido para separar o IGF 1 das proteínas de ligação ao IGF (Tvarijonavičiute et al., 2012).

A concentração sérica de Tiol foi determinada através de um método que usa dissulfetos aromáticos como reagentes, previamente validado para uso em gatos (Vilhena et al., 2019). A TAC foi determinada em todos os casos por três métodos espectrofotométricos, incluindo o TEAC, o CUPRAC e o FRAP. A concentração sérica de TEAC foi determinada através de um método que utiliza a peroxidase de rábano, previamente validado em gatos (Vilhena et al., 2019). O ensaio CUPRAC foi determinado por um método que usa o ácido batocuproíndissulfônico dissódico como agente quelante, previamente validado para uso em soro felino (Vilhena et al., 2019). O ensaio FRAP usa o complexo férrico tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) como reagente, através de um método validado em gatos (Vilhena et al., 2019).

A determinação sérica de todos os analitos avaliados foi realizada num analisador bioquímico automatizado (Olympus AU600, Olympus Diagnostica, GmbH).



2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como medianas com intervalos interquartis (IQR), salvo indicação em contrário. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a distribuição dos dados. Como a maioria dos dados não apresentava distribuição normal, as comparações entre grupos foram realizadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon para duas amostras independentes, aplicando correções de continuidade quando necessário. Para comparar as concentrações de analitos entre gatos saudáveis e gatos doentes, foi utilizado o teste de Wilcoxon, incluindo ajustes para empates nos dados. Para avaliar a influência de fatores clínicos e demográficos (como o sexo, a raça, o estado reprodutivo e a presença de efusão pleural) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi utilizado um nível de significância de $P < 0,05$ para determinar a significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas com recurso ao software RStudio.



3. RESULTADOS

As concentrações séricas de PFA e de antioxidantes (apresentadas como medianas e intervalos interquartil) dos gatos com linfoma de alto grau e dos animais do grupo controlo são apresentados na tabela 2. Os animais doentes apresentaram concentrações séricas de SAA significativamente superiores, e de BChE, IGF 1 e da TAC determinada através dos métodos TEAC e CUPRAC significativamente inferiores em relação aos animais saudáveis.

Tabela 2. Concentração sérica de SAA, Hp, BChE, IGF 1, Tiol, TEAC, CUPRAC e FRAP nos gatos com linfoma (n=24) e nos gatos do grupo controlo (n=12)

	Grupo linfoma mediana (IQR)	Grupo controlo mediana (IQR)	P
SAA (µg/ml)	36,35 (0,38-58,6)	0,38 (0,38-0,38)	0.002
Hp (mg/dL)	386,6 (297,9-473,1)	354,8 (273,3-437,0)	0,146
BChE (µmol/ml.min)	1,1 (0,7-1,7)	1,5 (0,9-2,3)	0.005
IGF 1 (ng/ml)	31,5 (15,0-183,5)	127,5 (31,2-263,0)	0,001
Tiol (mmol/l)	0,20 (0,15-0,25)	0,205 (0,130-0,262)	0,240
TEAC (mmol/L)	0,312 (0,257-0,393)	0,366 (0,276-0,580)	<0,001
CUPRAC (mmol/L)	0,330 (0,293-0,391)	0,361 (0,311-0,454)	<0,001
FRAP (mmol/L)	0,350 (0,312-0,446)	0,370 (0,311-0,454)	0,118

BChE, butirilcolinesterase; CUPRAC, capacidade antioxidante redutora cúprica; FRAP, capacidade antioxidante redutora férrica; Hp, haptoglobina; IGF 1, fator de crescimento semelhante à insulina 1; IQR, intervalo interquartil; SAA, proteína sérica amiloide A; TAC, capacidade antioxidante total; Tiol, tiol sérico total. As diferenças significativas são apresentadas em negrito.

A análise da influência das características clinicopatológicas dos gatos com linfoma de alto grau (raça, género, estado reprodutivo, idade, infeção por FIV e/ou FeLV, localização anatómica do linfoma, estadio clínico e presença de efusão pleural) na concentração dos diferentes analitos avaliados (apresentada na tabela 3) mostrou que os animais doentes com efusão pleural apresentaram níveis séricos de BChE significativamente inferiores

aos dos animais sem efusão. Adicionalmente, a concentração sérica de IGF 1 foi significativamente inferior em gatos doentes infetados por FIV e FeLV do que nos animais não infetados, e em gatos doentes não castrados do que em gatos doentes castrados. Não foram detetadas outras influências significativas das características clinicopatológicas dos gatos doentes sobre a concentração sérica das PFA e dos biomarcadores de stresse oxidativo analisados.

Tabela 3. *P*-valor da influência das características clinicopatológicas dos animais com linfoma de alto grau na concentração sérica das PFA e biomarcadores de stresse oxidativo analisados

	SAA	HP	BChE	IGF1	Tiol	TEAC	CUPRAC	FRAP
Raça	0,169	0,220	0,611	0,196	0,348	0,613	0,220	0,516
Género	0,426	0,427	0,302	0,610	0,599	0,768	0,846	0,273
Estado reprodutivo	0,491	0,674	0,551	0,030	0,575	0,837	0,726	0,363
Idade	0,281	0,922	0,411	0,384	0,448	0,437	0,383	0,551
FIV	0,653	0,804	0,302	0,928	0,937	0,737	0,446	0,937
FeLV	0,259	0,411	0,117	0,178	0,733	0,613	0,934	0,847
FIV / FeLV	0,119	0,442	0,106	0,047	0,543	0,392	0,758	0,934
Forma anatómica	0,653	0,500	0,253	0,690	0,852	0,840	0,963	0,854
Estadio clínico	0,651	0,498	0,772	0,538	0,167	0,149	0,201	0,291
Efusão pleural	0,858	0,976	0,025	0,162	0,743	0,493	0,222	0,612

BChE, butirilcolinesterase; CUPRAC, capacidade antioxidante redutora cúprica; FeLV, vírus da leucemia felina; FIV, vírus da imunodeficiência felina; FRAP, capacidade antioxidante redutora férrica; Hp, haptoglobina; IGF 1, fator de crescimento semelhante à insulina 1; SAA, proteína sérica amilóide A; TAC, capacidade antioxidante total; Tiol, tiol sérico total. As diferenças significativas são apresentadas em negrito.

4. DISCUSSÃO

A avaliação da RFA e do estado oxidativo do organismo tem sido utilizada para a identificação de biomarcadores em diversas doenças em medicina humana e veterinária, incluindo em diversas doenças oncológicas (Gabay et al., 1999; Vilhena et al., 2019; Tuna, 2022). O presente estudo pretendeu avaliar a resposta inflamatória em gatos com linfoma de alto grau, incluindo gatos com linfomas em diferentes localizações anatômicas e em diferentes estádios clínicos, através de um perfil de PFA que incluiu uma PFA positiva maior (SAA), uma PFA positiva moderada (Hp) e duas PFA negativas (BChE e IGF 1). A avaliação de perfis de PFA que incluam pelo menos uma PFA positiva maior, uma PFA positiva moderada e uma PFA negativa são recomendados em relação à determinação de parâmetros individuais, uma vez que permitem uma melhor diferenciação entre estados patológicos e obter informação sobre a evolução da doença (Cerón, et al., 2008). Para além disso, foi também avaliada a resposta antioxidante nos mesmos animais, através de um perfil que incluiu a determinação da concentração sérica de um antioxidante individual (Tiol) e da TAC através de três métodos diferentes (TEAC, CUPRAC e FRAP). Alguns autores recomendam que a determinação da TAC em amostras biológicas deve ser realizada através de diferentes métodos, uma vez que se baseiam em diferentes reações químicas, pelo que fornecem informação diferenciada, o que permite uma melhor caracterização do estado antioxidante do organismo (Islam et al., 2012; Rubio et al., 2016a; Rubio et al., 2016b).

Os resultados obtidos no nosso estudo mostraram que os gatos com linfoma espontâneo de alto grau desenvolvem uma resposta das PFA, uma vez que foram detetadas alterações significativas nas concentrações séricas de PFA nos gatos doentes quando comparadas com os gatos saudáveis, nomeadamente um aumento da SAA, e uma diminuição da BChE e da IGF 1. Diferentes estudos em medicina humana e em medicina veterinária reportaram uma resposta das PFA em diferentes doenças oncológicas, incluindo linfoma em cães (Tecles et al., 2005; Merlo et al., 2008). Estudos anteriores avaliaram também a resposta das PFA em gatos com linfoma, no entanto, o seu valor na prática clínica não é ainda completamente conhecido. Aumentos significativos na concentração sérica das PFA positivas maiores SAA e AGP foram anteriormente reportados em gatos com linfoma no momento do diagnóstico (Correa et al., 2001; Winkel et al., 2015; Schiavo et al., 2022; Akiyoshi et al., 2023). No entanto, os mesmos estudos não mostraram valor prognóstico da concentração sérica destas PFA determinadas no momento do diagnóstico. Love e colaboradores (2021), não encontraram diferenças na concentração sérica de Hp entre gatos com linfoma de baixo grau e doença inflamatória intestinal. Tal como no nosso estudo, Tschur e colaboradores (2012), também detetaram uma diminuição significativa da concentração sérica de IGF 1 em gatos com linfoma, pelo que este analito poderá eventualmente mostrar-se um biomarcador com interesse clínico no linfoma felino. O nosso perfil de PFA incluiu ainda a avaliação da concentração sérica de BChE em gatos com linfoma, tendo estes apresentado uma diminuição significativa da sua concentração em relação aos animais do grupo controlo. Que tenhamos conhecimento, nenhum estudo anterior avaliou a concentração de BChE em gatos com linfoma. Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com os obtidos nos estudos anteriores, nomeadamente no aumento significativo da SAA, mas não da Hp, e uma diminuição significativa de PFA negativas em gatos com linfoma no momento do diagnóstico (Correa et al., 2001;



Winkel et al., 2015; Love et al., 2021; Schiavo et al., 2022; Akiuoshi et al., 2023). No entanto, no presente estudo, não foi avaliado o valor prognóstico da concentração sérica das PFA determinado no momento do diagnóstico nos animais com esta doença oncológica.

Diversos estudos avaliaram o estado oxidativo em diferentes doenças oncológicas caninas, incluindo o linfoma no cão, no momento do diagnóstico e também após resposta ao tratamento (Vajdovich et al., 2005; Winter et al., 2009; Bottari et al., 2015). Todos os estudos identificaram desenvolvimento de stresse oxidativo nos cães com linfoma, no entanto, alguns estudos detetaram aumentos significativos e outros diminuições significativas nos biomarcadores de stresse oxidativo (agentes oxidantes e agentes antioxidantes). Estas diferenças são provavelmente referentes aos diferentes métodos e diferentes condições dos ensaios utilizados para avaliar os biomarcadores de stresse oxidativo, e/ou porque as alterações no estado oxidativo podem ocorrer consoante o estado e gravidade da doença (Winter et al., 2009; Tecles et al., 2015; Rubio et al., 2017). Alterações nos parâmetros do estado oxidativo foram também já anteriormente reportados em diferentes doenças felinas, no entanto, a informação científica disponível em relação a doenças oncológicas é muito escassa (Tecles et al., 2015; Vilhena et al., 2019; Vilhena et al., 2018), e que tenhamos conhecimento, ainda não foi avaliada em gatos com linfoma. Um estudo realizado em gatas com adenocarcinomas mamários mostrou que, ao diagnóstico, estas apresentavam diminuição significativa nas concentrações séricas de glutathione peroxidase (considerado um analito antioxidante em gatos) e da TAC determinada por TEAC e CUPRAC, mas não de Tiol e da TAC determinada pelo método FRAP (Vilhena et al., 2019). No entanto, reportou que as concentrações séricas de Tiol e FRAP eram significativamente menores em gatas doentes que apresentavam êmbolos vasculares neoplásicos e metástases nos linfonodos regionais e/ou à distância do que nas gatas doentes sem estas alterações (Vilhena et al., 2019). Os resultados do nosso estudo mostraram também uma resposta antioxidante nos gatos com linfoma de alto grau. Apesar de não ter sido avaliada a concentração de agentes oxidantes no presente estudo, esta diminuição reflete, provavelmente, o dano oxidativo provocado pela doença. Considerando que os métodos utilizados para a determinação da concentração sérica dos diferentes analitos avaliados em gatas com adenocarcinomas mamários e nos gatos com linfoma foram semelhantes, as diferenças encontradas entre as duas doenças podem ser devidas a diferenças na resposta antioxidante entre os dois processos, tornando estes analitos interessantes como biomarcadores da doença. No entanto, tal como descrito anteriormente em cães, não podemos descartar que as diferenças sejam devidas a variações no estado e gravidade da doença, ou mesmo em pequenas variações nas condições dos ensaios analíticos usados para determinar os antioxidantes.

Neste estudo foi ainda avaliada a influência de diferentes parâmetros clinicopatológicos sobre a concentração sérica das PFA e antioxidantes analisados. Apenas foi observada uma influência significativa sobre a concentração sérica das PFA negativas, com os gatos doentes com efusão pleural a apresentarem níveis séricos de BChE significativamente inferiores aos dos animais sem efusão, e os animais com linfoma e infetados com FIV e/ou FeLV apresentaram uma diminuição significativa da concentração de IGF 1 em relação aos animais doentes não infetados. A ausência de outras alterações nos analitos avaliados em função da presença de fatores



clínicopatológicos associados a um pior prognóstico poderá ser explicada, pelo menos em parte, pelo reduzido número de animais doentes em cada grupo.

Este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados, nomeadamente o seu carácter retrospectivo, o reduzido número de animais da amostra e o facto de incluir, no grupo de animais doentes, um grupo heterogéneo de gatos com doença com diferentes localizações anatómicas e em diferentes estadios clínicos. Para além disso, a monitorização da variação dos diferentes analitos avaliados com a progressão da doença e/ ou resposta ao tratamento, assim como a avaliação do valor prognóstico da concentração sérica das PFA e dos biomarcadores de stresse oxidativo avaliados no momento do diagnóstico ou durante o curso da doença poderia permitir a obtenção de mais informação clínica.

5. CONCLUSÃO

Este estudo reportou uma resposta das PFA que foi avaliada através de um perfil de PFA que incluiu uma PFA maior - SAA, uma PFA moderada - Hp e duas PFA negativas - BChE e IGF 1, e uma resposta antioxidante avaliada através de um perfil de antioxidantes que incluiu o Tiol e a determinação da TAC através de três métodos analíticos diferentes - TEAC, CUPRAC e FRAP em gatos com linfoma de alto grau. Os resultados obtidos sugerem que as PFA SAA, BChE e IGF 1, e os antioxidantes TEAC e CUPRAC podem ser biomarcadores de interesse do linfoma felino. No entanto, são necessários estudos futuros, com um maior número de animais, que permitam avaliar grupos mais homogêneos de gatos com doenças com a mesma localização anatômica e no mesmo estadio clínico, para avaliar o valor clínico destes analitos no linfoma felino. Estudos com monitorização da concentração sérica destes analitos ao longo da progressão da doença poderão também contribuir para melhor compreender a sua aplicação na prática clínica.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyoshi, M., Hisasue, M., Neo, S., & Akiyoshi, M. (2023). Serum amyloid A (SAA) concentration in cats with gastrointestinal lymphoma. *The Journal of veterinary medical science*, 85(8), 867–875. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0043>
- Bertone, E. R. (2002). Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *American journal of epidemiology*, 156 (3), 268–273. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf044>
- Bottari, N. B., Munhoz, T. D., Torbitz, V. D., Tonin, A. A., Anai, L. A., Semolin, L. M., Jark, P. C., Bollick, Y. S., Moresco, R. N., França, R. T., Lopes, S. T., Stefani, L. M., Tinucci-Costa, M., & Da Silva, A. S. (2015). Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma: Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. *Redox report: communications in free radical research*, 20(6), 267–274. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000037>
- Burkhard, M. J., & Bienzle, D. (2013). Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 43(6), 1331–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.07.004>
- Cerón, J. J., Martinez-Subiela, S., Ohno, K., & Caldin, M. (2008). A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Veterinary journal*, 177(1), 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.001>
- Cerón, J. J. (2019). Acute phase proteins, saliva and education in laboratory science: an update and some reflections. *BMC veterinary research*, 15(1), 197. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1931-8>
- Correa, S. S., Mauldin, G. N., Mauldin, G. E., & Mooney, S. C. (2001). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(2), 153–158. <https://doi.org/10.5326/15473317-37-2-153>
- Dąbrowski, R., Szczubiał, M., Kostro, K., Wawron, W., Ceron, J. J., & Tvarijonaviciute, A. (2015). Serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein concentrations before and after ovariohysterectomy in bitches with pyometra. *Theriogenology*, 83(4), 474–477. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.024>
- Escribano, D., Bustillo, A. O., Marín, L. P., Rabasco, A. N., Herrera, P. R., Cerón, J. J., & Tvarijonaviciute, A. (2021). Analytical Validation of Two Point-of-Care Assays for Serum Amyloid A Measurements in Cats. *Animals*, 11(9), 2518. <https://doi.org/10.3390/ani11092518>
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>



- Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine*, 340(6), 448–454. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>
- Gambini, M., Martini, V., Bernardi, S., Caniatti, M., Gelain, M. E., Roccabianca, P., & Comazzi, S. (2021). Cytology of Feline Nodal Lymphoma: Low Interobserver Agreement and Variable Accuracy in Immunophenotype Prediction. *Journal of comparative pathology*, 184, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.01.007>
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of Inflammation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1803, 57–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5
- Hartmann, K. (2012). Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*, 4(11), 2684–2710. <https://doi.org/10.3390/v4112684>
- Hansen, A. E., Schaap, M. K., Kjelgaard-Hansen, M. (2006). Avaliação de um imunoensaio turbidimétrico de amiloide A sérica humana (SAA) comercialmente disponível para determinação da concentração de SAA em felinos. *Comunicações de Pesquisa Veterinária*, 30 (8), 863–872. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3373-6>
- Hazuchova, K., Held, S., & Neiger, R. (2017). Usefulness of acute phase proteins in differentiating between feline infectious peritonitis and other diseases in cats with body cavity effusions. *Journal of feline medicine and surgery*, 19(8), 809–816. <https://doi.org/10.1177/1098612X16658925>
- Heini, A. D., Hugo, R., Berger, M. D., Novak, U., Bacher, U., & Pabst, T. (2020). Simple acute phase protein score to predict long-term survival in patients with acute myeloid leukemia. *Hematological oncology*, 38(1), 74–81. <https://doi.org/10.1002/hon.2696>
- Islam, M. S., Matsumoto, M., Hidaka, R., Miyoshi, N., & Yasuda, N. (2012). Expression of NOS and VEGF in feline mammary tumours and their correlation with angiogenesis. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 192(3), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.032>
- Kleinschmidt, S., Harder, J., Nolte, I., Marsilio, S., & Hewicker-Trautwein, M. (2010). Chronic inflammatory and non-inflammatory diseases of the gastrointestinal tract in cats: diagnostic advantages of full-thickness intestinal and extraintestinal biopsies. *Journal of feline medicine and surgery*, 12(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.07.004>
- Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C., & Lyons, L. A. (2005). Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *Journal of veterinary internal medicine*, 19(3), 329–335. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19\[329:flitpl\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[329:flitpl]2.0.co;2)



Love, E. K., Leibman, N. F., Ringold, R., & Lamb, K. (2021). Serum haptoglobin concentrations in feline inflammatory bowel disease and small-cell alimentary lymphoma: a potential biomarker for feline chronic enteropathies. *Journal of feline medicine and surgery*, 23(10), 959–964. <https://doi.org/10.1177/1098612X21991448>

Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 38(1), 1–v. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005>

Merlo, A., Rezende, B. C., Franchini, M. L., Monteiro, P. R., & Lucas, S. R. (2008). Serum amyloid A is not a marker for relapse of multicentric lymphoma in dogs. *Veterinary clinical pathology*, 37(1), 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00016.x>

Mitchell, K. D., Kruth, S. A., Wood, R. D., & Jefferson, B. (2009). Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(3), 585–591. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0282.x>

Moore, P. F., Rodriguez-Bertos, A., & Kass, P. H. (2012). Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Veterinary pathology*, 49(4), 658–668. <https://doi.org/10.1177/0300985811404712>

Paltrinieri, S. (2008). The feline acute phase reaction. *Veterinary journal*, 177(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.06.005>

Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary clinical pathology*, 45(4), 552–578. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>

Richter, K. P. (2003). Feline gastrointestinal lymphoma. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33(5), 1083–vii. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00054-8)

Rossi, G. (2023). Acute phase proteins in cats: Diagnostic and prognostic role, future directions, and analytical challenges. *Veterinary Clinical Pathology*, 52(S1), 37–49. <https://doi.org/10.1111/vcp.13238>

Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Ceron, J. J. (2016a). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC veterinary research*, 12(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0792-7>

Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Arnao, M. B., & Ceron, J. J. (2016b). Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 28(6), 693–698. <https://doi.org/10.1177/1040638716664939>



- Rubio, C. P., Martínez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J. J., & Allenspach, K. (2017). Serum biomarkers of oxidative stress in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary journal*, 221, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.02.003>
- Sánchez-Rodríguez, M. A., & Mendoza-Núñez, V. M. (2019). Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4128152. <https://doi.org/10.1155/2019/4128152>
- Schiavo, L., Odatzoglou, P., Hare, C., Williams, T. L., & Dobson, J. M. (2022). Serum amyloid A and other clinicopathological variables in cats with intermediate- and large-cell lymphoma. *Journal of feline medicine and surgery*, 24(12), e603–e610. <https://doi.org/10.1177/1098612X221135118>
- Schmidt, J. M., North, S. M., Freeman, K. P., & Ramiro-Ibañez, F. (2010). Feline paediatric oncology: retrospective assessment of 233 tumours from cats up to one year (1993 to 2008). *The Journal of small animal practice*, 51(6), 306–311. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00915.x>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Cerón, J. J., & Paltrinieri, S. (2005). Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of veterinary internal medicine*, 19(6), 865–870. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19\[865:psosap\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[865:psosap]2.0.co;2)
- Tecles, F., Caldín, M., Tvarijonaviciute, A., Escribano, D., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2015). Serum biomarkers of oxidative stress in cats with feline infectious peritonitis. *Research in veterinary science*, 100, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.02.007>
- Thamm, D. H. (2019). Novel Treatments for Lymphoma. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 49(5), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.004>
- Thrall, M., (2007) Diagnostic cytology in clinical oncology, em *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier, pp. 112–133.
- Tschuor, F., Zini, E., Schellenberg, S., Wenger, M., Boretti, F. S., & Reusch, C. E. (2012). Evaluation of four methods used to measure plasma insulin-like growth factor 1 concentrations in healthy cats and cats with diabetes mellitus or other diseases. *American journal of veterinary research*, 73 (12), 1925-1931. Disponível em doi.org/10.2460/ajvr.73.12.1925

Tvarijonaviciute, A., Ceron, J. J., Holden, S. L., Morris, P. J., Biourge, V., & German, A. J. (2012). Effects of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflammation and glucose homeostasis. *Domestic animal endocrinology*, 42(3), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.10.003>

Tuna, G. E., & Ulutas, B. (2022). Investigation of acute-phase protein concentrations in healthy and various diseased cats. *Polish journal of veterinary sciences*, 25(4), 589–597. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2022.143545>

Valli, V. E., (2007) Book review: Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology, *Veterinary pathology*, 44(5), pp. 729–730. Disponível em doi: 10.1354/vp.44-5-729-a.

Vail, D. M. (2013) *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Editado por S. Withrow. Missouri: Saunders: Elsevier. p. 638-650

Vail, D. M., Thamm, D. H., Liptak, J. M., (2017) Hematopoietic tumors, em *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier, pp. 688–772.

Vajdovich, P., Kriska, T., Mézes, M., Szabó, P. R., Balogh, N., Bánfi, A., Arany-Tóth, A., Gaál, T., & Jakus, J. (2005). Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. *Cancer letters*, 224(2), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.037>

Versteegh, H., Zandvliet, M. M. J. M., Feenstra, L. R., van der Steen, F. E. M. M., & Teske, E. (2023). Feline Lymphoma: Patient Characteristics and Response Outcome of the COP-Protocol in Cats with Malignant Lymphoma in The Netherlands. *Animals*, 13(16), 2667. <https://doi.org/10.3390/ani13162667>

Vilhena, H., Figueiredo, M., Cerón, J. J., Pastor, J., Miranda, S., Craveiro, H., Pires, M. A., Tecles, F., Rubio, C. P., Dabrowski, R., Duarte, S., Silvestre-Ferreira, A. C., & Tvarijonaviciute, A. (2018). Acute phase proteins and antioxidant responses in queens with pyometra. *Theriogenology*, 115, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.010>

Vilhena, H., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J. J., Figueira, A. C., Miranda, S., Ribeiro, A., Canadas, A., Dias-Pereira, P., Rubio, C. P., Franco, L., Tecles, F., Cabeças, R., Pastor, J., & Silvestre-Ferreira, A. C. (2019). Acute phase proteins and biomarkers of oxidative status in feline spontaneous malignant mammary tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 17(3), 394–406. <https://doi.org/10.1111/vco.12486>

Winkel, V. M., Pavan, T. L., Wirthl, V. A., Alves, A. L., & Lucas, S. R. (2015). Serum α -1 acid glycoprotein and serum amyloid A concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. *American journal of veterinary research*, 76(11), 983–988. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.11.983>



Winter, J. L., Barber, L. G., Freeman, L., Griessmayr, P. C., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2009). Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(2), 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0273.x>

